

HPLC-MS/MS 测定延胡索中的 12 种农药残留

马临科, 方翠芬, 李文庭, 赵维良* (浙江省食品药品检验研究院, 杭州 310004)

摘要: 目的 建立液相色谱-串联质谱法测定延胡索药材中 12 种农药残留的方法。方法 延胡索样品用乙腈提取, 过 *N*-丙基乙二胺(PSA)柱净化, 用 ZORBAX Eclipse plus C₁₈ 色谱柱分离, 以电喷雾电离串联质谱在正离子多反应监测(MRM)模式下进行测定, 内标法定量。结果 12 种农药成分在相应的测定范围内线性关系良好, 相关系数在 0.997 7~0.999 9 内, 加样回收率范围为 65.5%~117.8%, RSD 范围为 0.4%~4.5%, 各农药的检出限为 0.1~2.5 μg·kg⁻¹。结论 本方法简便、灵敏、重现性好, 可用于延胡索药材中 12 种农药残留的同时检测。延胡索药材农药残留量甚微, 符合安全性要求。

关键词: 延胡索; 多农药残留; 液相色谱-串联质谱法; 安全监测

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2014)04-0470-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.04.022

Simultaneous Determination of 12 Pesticide Residues in *Corydalis Rhizoma* by HPLC-MS/MS

MA Linke, FANG Cuifen, LI Wenting, ZHAO Weiliang* (*Zhejiang Institute for Food and Drug control, Hangzhou 310004, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method based on LC-MS/MS for the determination of 12 kinds of pesticide residues in *Corydalis Rhizoma*. **METHODS** *Corydalis Rhizoma* samples were extracted with acetonitrile, and purified by *N*-propylethylenediamine(PSA) column. The prepared samples were analyzed using LC-MS/MS in multiple reaction monitoring(MRM) mode by positive electrospray ionization with a ZORBAX Eclipse plus C₁₈ column as the analytical column. The pesticides were quantified by the internal standard method. **RESULTS** All the 12 pesticides showed good linearity in their reasonable range($r=0.997\ 7-0.999\ 9$), the recoveries were 65.5%–117.8%, with the RSDs of 0.4%–4.5%. The limits of detection were 0.1–2.5 μg·kg⁻¹. **CONCLUSION** The method established in this study is simple, sensitive and reproductive which can be applied on the analysis of pesticide residues in *Corydalis Rhizoma*. The quality of *Corydalis Rhizoma* is basically good for the safety although it contains a trace of several pesticides residues.

KEY WORDS: *Corydalis Rhizoma*; multiple pesticide residues; LC-MS/MS; safety monitoring

延胡索又名元胡, 是“浙八味”之一, 收载于历版中国药典, 具活血、利气、止痛之功效, 用于胸胁、脘腹疼痛、经闭痛经、产后瘀阻, 跌扑肿痛^[1], 为大宗常用中药。目前延胡索药材多为人工栽培, 其种植过程中多发的病虫害主要为霜霉病、菌核病、锈病和元胡龟象等, 常用的农药有甲霜灵、乙烯菌核利、三唑酮、多菌灵、毒死蜱、氟虫腈、阿维菌素等。对延胡索中农药残留的测定曾有报道, 其检测对象多局限在有机氯类农药的测定^[2-4], 但由于该类农药已禁用多年, 多未检出或仅有痕量残留。笔者根据延胡索病虫害的发生和农药的使用情况, 并结合其种植区域环境所用农药等情况, 选择了甲霜灵、三唑酮、毒

死蜱等 12 种常见农药作为检测对象, 建立延胡索药材中的农药残留测定方法, 对延胡索中农药残留进行监测。

1 仪器和试剂

Agilent 1200 液相色谱-6430 三重四极杆串联质谱仪(美国 Agilent 公司), 配有电喷雾离子源(ESI); SUPELCO 固相萃取仪; N-EVAPTM111 型氮气吹干仪(美国 Organomation Associates Inc 公司); R215 型旋转蒸发仪(瑞士 Büchi 公司); AG285 型分析天平(德国 Sartorius 公司)。

乙腈、甲醇均为色谱纯(德国 Merck 公司); *N*-丙基乙二胺柱(DIKMA 公司, 规格: 500 mg/6 mL); 无水硫酸钠(国药集团化学试剂有限公司),

基金项目: 国家药典委员会研究基金(1677)

作者简介: 马临科, 男, 硕士, 副主任中药师 Tel: (0571)86459761 E-mail: marlink78@126.com *通信作者: 赵维良, 男, 硕士, 硕导 Tel: (0571)86452373 E-mail: zwl@zjyj.org.cn

分析纯)。12种农药的对照品均来源于 Dr. Ehrensterfer(纯度均>97.0%);内标磷酸三苯酯(美国 Sigma 公司,批号: P0272,纯度: 99%)。

共收集延胡索样品 20 批,其中浙江磐安各种植点 10 批(No.1~10)、浙江缙云各种植点 2 批(No.11~12)、浙江中医药大学饮片厂 3 批(No.13~15)、桐君堂医药 1 批(No.16)、安徽亳州永刚饮片厂 2 批(No.17~18)、安徽亳州药材市场 2 批(No.19~20)。产地除 No.14, 18, 20 为陕西和 No.15 为江苏外,其余均为浙江。样品经浙江省食品药品检验研究院郭增喜主任中药师鉴定均为药材延胡索 *Corydalis Rhizoma*。收集的样品代表性强,基本囊括了延胡索的主要产地及种植、加工和销售点。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液制备

称取本品粉末(过 3 号筛)5.0 g,精密加入乙腈 50 mL,放置 30 min,于冰浴中超声处理 30 min,离心,取上清液,加无水硫酸钠 5 g,放置 30 min,精密量取 10 mL 于 40 °C 减压浓缩至约 1 mL,置 PSA 小柱(加样前柱上加约 1 cm 无水硫酸钠,用乙腈 10 mL 预淋洗)上,用乙腈洗涤容器 3 次,每次 1 mL,洗液置同一小柱上,用乙腈 25 mL 洗脱,收集洗脱液,40 °C 减压浓缩至约 1 mL,置氮吹仪上吹至近干,加入内标溶液[以甲醇-水(3:2)为溶剂,浓度为 0.24 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$]100 μL ,加入 60%甲醇 900 μL ,超声使溶解,混匀,离心,即得。

2.2 对照品溶液的制备

2.2.1 对照品和内标储备溶液的制备 精密称取各农药对照品和磷酸三苯酯适量,用甲醇分别制成约 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 储备液。

2.2.2 内标溶液的制备 精密吸取内标储备溶液适量,用甲醇-水(3:2)制成内标浓度为 0.24 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液。

2.2.3 混合对照品溶液的制备 精密吸取各农药对照品储备溶液适量,用甲醇-水(3:2)制成浓度分别为 12, 18, 36, 60, 120, 180, 300 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 混合对照品溶液,并分别加入内标储备液适量,使内标的浓度为 24 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.2.4 基质混合标准品溶液的制备 取不含农药的空白样品基质,按“2.1”项下方法处理,氮吹仪上吹至近干,加入上述混合对照品溶液各 1 mL,摇匀,即得。

2.3 色谱条件

色谱柱: ZORBAX Eclipse plus C_{18} (2.1 mm \times 100 mm, 1.8 μm);流动相: A 相: 水(含 0.1%甲酸及 5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甲酸铵); B 相: 乙腈(含 5%水, 0.1%甲酸及 5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甲酸铵);梯度洗脱: 0~0.3 min, 90%A; 0.3~4 min, 90%A \rightarrow 60%A; 4~13 min, 60%A \rightarrow 40%A; 13~15 min, 40%A \rightarrow 5%A; 15~20 min, 5%A;流速: 0.4 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$;柱温: 40 °C;进样量: 5 μL 。

2.4 质谱条件

电离源模式: 电喷雾离子化;电离源极性: 正模式;雾化气: 氮气;雾化气压力: 50 psi;扫描方式: 正离子扫描;检测方式: 多反应监测(MRM);电喷雾电压: 4 000 V;离子源温度: 350 °C;干燥气温度: 350 °C;干燥气流速: 12 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 。其余参数见表 1。质谱图见图 1。

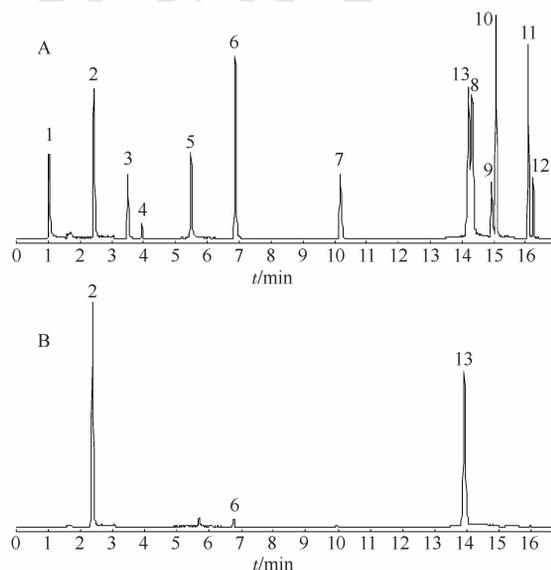


图 1 混合对照品(A)和延胡索(B)的总离子流图

1-甲胺磷; 2-多菌灵; 3-敌百虫; 4-吡虫啉; 5-敌敌畏; 6-甲霜灵; 7-三唑酮; 8-二嗪磷; 9-甲拌磷; 10-辛硫磷; 11-毒死蜱; 12-氟啶脲; 13-磷酸三苯酯(内标)

Fig 1 TIC of mixed reference substance(A) and sample(B)
1-methamidophos; 2-carbendazim; 3-trichlorfon; 4-imidacloprid; 5-dichlorvos; 6-metalaxyl; 7-triadimefon; 8-diazinon; 9-phorate; 10-phoxim; 11-chlorpyrifos; 12-chlorfluazuron; 13-triphenylphosphat

2.5 分析方法的验证

2.5.1 标准曲线 精密吸取 7 个不同浓度的基质混合标准品溶液各 5 μL ,进样,记录各待测组分与内标 MRM 色谱峰面积,以各成分的浓度与内标浓度比为横坐标(X),各成份的峰面积与内标峰面积比为纵坐标(Y),进行回归分析,得标准曲线,结果见表 2。结果均能满足农药残留检测要求。

表1 农药对照品及检测参数

Tab 1 The species and detection parameters of pesticides

序号	农药对照品	保留时间/ min	母离子/ m/z	定量离子峰/ m/z	定性离子峰/ m/z	定量定性离子 相对丰度比	源内碎裂 电压/V	碰撞气能量/V	
								定量	定性
1	甲胺磷	0.93	142.0	94.1	125.0	100:48	92	10	10
2	多菌灵	2.24	192.1	160.1	132.1	100:20	88	14	34
3	敌百虫	3.32	256.9	109.1	221.0	100:28	86	14	6
4	吡虫啉	3.73	256.1	209.1	175.1	100:91	100	10	14
5	敌敌畏	5.26	221.0	108.9	145.0	100:5	120	15	15
6	甲霜灵	6.63	280.2	220.1	192.1	100:72	86	10	14
7	三唑酮	9.74	294.1	197.1	225.1	100:49	98	10	6
8	二嗪磷	13.81	305.1	169.1	153.1	100:78	118	18	18
9	甲拌磷	14.53	261.0	74.9	199.0	100:6	64	1	4
10	辛硫磷	14.75	299.1	129.1	77.1	100:85	76	2	30
11	毒死蜱	15.87	349.9	97.0	198.0	100:86	100	34	10
12	氟啶脲	16.06	540.0	382.9	158.0	100:34	124	16	20
13	磷酸三苯酯(内标)	13.62	327.1	214.7	77.0	/	70	5	17

表2 12种农药对照品线性考察结果

Tab 2 Linear test results of 12 pesticide standards

农药对照品	线性范围/ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	线性方程	r
多菌灵	1.173~29.32	$Y=0.269 1X+0.286 9$	0.999 1
氟啶脲	16.79~419.7	$Y=0.107 2X+0.000 3$	0.997 7
毒死蜱	25.15~628.8	$Y=0.219 6X+0.007 3$	0.998 9
二嗪磷	2.365~59.12	$Y=0.358 5X-0.000 7$	0.999 2
敌敌畏	11.97~299.2	$Y=0.250 0X+0.000 8$	0.999 8
吡虫啉	11.34~283.5	$Y=0.020 9X+0.000 7$	0.999 3
甲霜灵	2.466~61.66	$Y=0.342 9X+0.008 5$	0.999 8
甲胺磷	7.508~187.7	$Y=0.234 1X-0.032 4$	0.999 7
甲拌磷	25.87~646.7	$Y=0.164 0X+0.000 2$	0.999 9
辛硫磷	5.524~138.1	$Y=0.327 4X+0.006 4$	0.999 7
三唑酮	12.02~300.4	$Y=0.181 9X+0.006 0$	0.999 6
敌百虫	21.76~544.1	$Y=0.129 3X+0.000 2$	0.998 8

2.5.2 仪器精密度试验 取混合对照品溶液($60 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)连续进样6次,记录峰面积,计算待测物峰面积与内标峰面积的比值及相应的RSD值,考察仪器精密度,结果12种农药的RSD均在0.7%~4.7%内($n=6$),符合农药残留检测的要求^[5]。

2.5.3 重复性试验 采用考察加样回收率的方法来考察方法的重复性。称取6份样品粉末(过3号筛)5.0 g,置锥形瓶中,分别精密加入 $0.6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液(不含内标)各0.5 mL,按“2.1”项下方法配制供试品溶液,计算回收率及相应RSD值,考察方法重复性。结果见表3。上述测定农药各成分测得回收率RSD均 $<5.9\%$,重复性可

满足农药残留测试要求^[5]。

2.5.4 回收率试验和检出限 称取9份样品粉末(过3号筛)5.0 g,以3份为1组,分别精密加入 $0.6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液(不含内标)各0.15, 0.5, 1.5 mL,使样品浓度分别为0.018, 0.06, $0.18 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,按“2.1”项下方法配制供试品溶液,进样分析,计算回收率,同时以低浓度加样中噪音的3倍计算各农药检出限,结果见表3。12种农药的加样回收率基本上分布在65.5%~117.8%之间,检出限均低于 $2.5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,认为可满足农药残留测定的要求^[5]。

2.6 样品测定

按拟订方法对20批延胡索中农药残留进行测定,结果检出多菌灵、甲霜灵、三唑酮和辛硫磷,其余农药均未检出,测定结果见表4。从测定结果分析,12种农药中检出率最高的为多菌灵和甲霜灵,三唑酮和辛硫磷有少量检出但含量均很低,检出量最高为多菌灵,且其含量亦均在 $0.04 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 以下,故认为延胡索的农药残留风险较低。

3 讨论

曾比较不同的提取溶剂,结果用丙酮和甲醇提取较充分,但提取的杂质多,净化难度大。用乙腈提取,极性大小较合适,提取效率较高,且能减少对延胡索样品中亲脂性物质的影响。另曾采用先加水浸润,再用乙腈提取,结果提取效率不及乙腈,且提取液颜色明显偏深,故采用乙腈作为提取溶剂。

表 3 12 种农药标准品的重复性、回收率和检出限

Tab 3 Repeatability, recovery and lowest detectable limits of 12 pesticide standards

序号	农药对照品	重复性/%	低浓度		中浓度		高浓度		LOD/ mg·kg ⁻¹
			回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	
1	多菌灵	2.5	77.9	1.8	87.2	3.9	89.6	2.4	0.3
2	氟啶脲	3.2	111.4	1.4	113.3	4.5	117.8	3.7	0.3
3	毒死蜱	2.3	98.7	4.5	107.5	2.4	104.0	0.9	1.0
4	二嗪磷	2.1	83.1	2.9	90.7	2.4	92.3	1.6	0.1
5	敌敌畏	4.5	65.5	4.3	66.2	1.4	68.6	3.5	1.6
6	吡虫啉	1.3	95.6	1.9	97.6	1.2	94.8	1.5	0.8
7	甲霜灵	1.2	89.8	2.1	96.0	1.5	97.3	1.5	0.1
8	甲胺磷	2.7	94.9	4.4	91.5	3.5	94.8	0.4	0.8
9	甲拌磷	1.8	86.1	0.7	92.8	2.2	93.1	1.7	2.5
10	辛硫磷	1.2	95.8	2.0	100.7	1.6	100.0	1.5	0.2
11	三唑酮	1.4	85.4	1.8	92.7	1.8	94.95	1.7	1.2
12	敌百虫	5.9	98.6	2.1	98.2	2.6	99.0	4.3	0.4

表 4 延胡索样品中农药残留量测定结果

Tab 4 Results of pesticide residues in Corydalis Rhizoma

编号	多菌灵/mg·g ⁻¹	甲霜灵/mg·g ⁻¹	三唑酮/mg·g ⁻¹	辛硫磷/mg·g ⁻¹	编号	多菌灵/mg·g ⁻¹	甲霜灵/mg·g ⁻¹	三唑酮/mg·g ⁻¹	辛硫磷/mg·g ⁻¹
1	0.044	—	—	—	11	—	<0.002	<0.012	<0.005
2	<0.001	—	—	—	12	<0.001	<0.002	—	—
3	0.033	0.008 2	—	—	13	—	—	—	—
4	0.011	—	—	—	14	—	0.016 7	—	—
5	0.014	<0.002	<0.012	—	15	—	—	<0.012	—
6	0.001	<0.002	—	—	16	0.008	—	—	—
7	0.026	—	<0.012	—	17	—	—	<0.012	<0.005
8	0.002	—	—	—	18	—	0.004	—	—
9	0.005	—	—	—	19	—	0.008	—	—
10	0.005	—	—	<0.005	20	—	0.006	—	—

— 未检出

— Not detected

参考有关农药残留测定国标方法及相关文献^[6-10], 考察比较了佛罗里硅土柱、石墨化碳氨基串联柱、PSA 柱、TPH 柱等不同固相萃取柱的净化效果, 结果除在佛罗里硅土柱上有近半数的农药未被洗脱外, 12 种农药在石墨化碳氨基串联柱、PSA 柱上的回收率未见显著差别, 但采用后者回收率较集中, 且净化效果较好, 故选择 PSA 柱进行净化。另对洗脱溶剂和洗脱体积进行了优化比较, 分别考察了乙腈、丙酮-乙酸乙酯(1:1)、3% 甲醇的丙酮等不同洗脱溶剂以及不同洗脱体积, 结果采用 25 mL 乙腈已可基本洗脱完全, 并能达到良好净化效果。在 PSA 柱上装入适量无水硫酸钠, 以除去提取液中残余的极少量水分, 可有效防止 PSA 填料的吸附性能下降。

比较了 ZORBAX Eclipse plus C₁₈、ZORBAX SB C₁₈、shimpack ODS 等不同色谱柱, 结果 ZORBAX Eclipse plus C₁₈ 柱色谱峰峰形良好, 保留时间适中。采用梯度洗脱的方式, 提高了分析效率, 能在 17 min 内完成测定, 并使各离子峰有较高的响应。

从回收率数据上看, 除敌敌畏的回收率在 65%~68%, 以及多菌灵在低浓度时回收率为 78% 外, 其余农药回收率都在 80%~118% 之间。敌敌畏回收率较低可能与其沸点较低、挥发性较强有一定相关, 在氮气吹扫浓缩时一定要在近干时立即用溶剂进行溶解。另从回收率结果的离散性上分析, RSD 均<5%, 认为测定方法较为稳定, 可以满足测定要求。

采用液质联用测定复杂基质样品时, 基质对分析物的离子化具有增强或抑制效应。在延胡索中测定的上述农药成分主要表现为基质抑制效应, 其中敌百虫、吡虫啉基质抑制明显, 在基质中响应值分别仅为纯溶剂时的 37%和 13%, 采用基质匹配校准有效解决了测定中基质效应的影响, 使定量更为准确, 可作为延胡索农药残留的监测方法, 为提高延胡索药材的质量安全、控制农药残留提供了科学依据。

REFERENCES

- [1] Ch.P(2010)Vol I (中国药典 2010 年版.一部) [S]. 2010: 130-131.
- [2] HUANG W P, TANG H F, JIN F, et al. Determination of residues of heavy metal and organochlorine pesticides in eight famous herbal drugs in Zhejiang [J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊), 2013, 31(3): 624-627.
- [3] YANG L X, ZHANG Y X, ZHANG Q W, et al. Detection and determination of 19 organochlorine pesticide residues in Chinese herbal medicines by capillary gas chromatography [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2013, 19(4): 96-99.
- [4] CONG X D, LI Y, FANG W, et al. Studies on the residues of organo-chlorine pesticide in Rhizoma Corydalis, Radix Salviae Miltiorrhizae and Radix Paeoniae Alba [J]. J China Pharm Univ(中国药科大学学报), 1999, 30(2): 103-107.
- [5] European Union, Quality control procedures for pesticide residues analysis [N]. EC; SANCO/10232 /2006.
- [6] LIU P Y, MA Y S. Application of solid phase extraction in pesticide residue analysis [J]. J Hebei Univ(河北大学学报), 2005, 25(1): 109-115.
- [7] FANG C F, TAN C M, MA L K, et al. Determination of 12 kinds of pesticide residues in *Dendrobium officinale* prescription by HPLC/MS /MS [J]. Her Med(医药导报), 2012, 31(11): 1481-1484.
- [8] GB/T 23201-2008. Determination of 413 pesticides and related chemicals residues in mulberry twig, honeysuckle, Barbary wolfberry fruit and lotus leaf LC-MS-MS method [S]. 2008: 1-75.
- [9] LI Y, ZHENG F, WANG M L, et al. Rapid screening and confirmation of 156 pesticide residues in concentrated fruit and vegetable juices using liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr(色谱), 2009, 27(2): 127-137.
- [10] CHEN L, WANG L, WANG S M, et al. Poison analysis of organophosphorus pesticides by LC-MS/MS [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2013, 30(1): 90-95.

收稿日期: 2013-09-19

中国药学会关于举办第十二届全国青年药学工作者最新科研成果交流会的通知

中国药学会全国青年药学工作者最新科研成果交流会每两年举办一次, 从 1986 年至今已举办十一届, 历届会议对推动我国青年药学工作者创新发展, 着力培养青年人才, 提升创新能力, 推动国家药物创新体系建设发挥了重要作用。

由中国药学会主办, 中国药科大学、江苏省药学会承办, 国邦药业协办的第十二届全国青年药学工作者最新科研成果交流会定于 2014 年 6 月初在江苏省南京市召开, 会议将邀请两院院士作特邀报告, 并就我国青年药学科技领域最新研究进展及新技术、新成果进行广泛交流和探讨, 同时进行优秀论文评选活动。现将有关事宜通知如下。

征文及评奖

1. 征文范围: 药物化学、中药与天然药物、药理、药剂、药物分析、生化与生物技术药物、生物药品与质量、海洋药物、老年药学、制药工程、抗生素、医院药学、药事管理、军事药学、药物流行病学、药物经济学、药物安全评价、药物临床评价、医药知识产权、药学史等药学领域研究论文, 以及近年最新科研成果论文均在应征范围。论文要求立题明确、条理清晰、实验方法科学、具有创新性和前瞻性, 并没有在科技期刊公开发表。

2. 征文要求: 面向高等院校、科研院所、医疗机构、医药企业等青年工作者征文, 论文第一作者必须是年龄在 45 岁以下(1969 年 1 月 1 日以后出生)。应征论文字数限 3000 字以内(包括参考文献)。

3. 论文评审: 由中国药学会组织专家进行论文评审合格的论文将收录在大会论文集集中。遴选出 50 篇论文作会议报告交流, 每人 12 分钟以内, 并参加优秀论文评选。会议将设一等奖 2 名、二等奖 6 名、三等奖 10 名, 奖励金额(含税)分别为 2000 元、1000 元、600 元人民币, 并为获奖者颁发获奖证书。

4. 其他事项: 请将论文电子稿以 Word 格式编辑后发 E-mail 至: cpaswh@163.com, 并注明稿件所属专业, 以便于论文评审; 文责自负。收到每篇稿件后, 将及时给作者邮件回复。

会议获奖论文推荐在《中国药学杂志》、《药学报》、《中国中药杂志》、《中国临床药理学杂志》等中国药学会主办期刊发表。

5. 征文截止日期: 2014 年 5 月 9 日。